

包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒的制备、表征及其口服药动学研究

刘艳菊¹, 武月丹¹, 位小杰¹, 方雨欣¹, 李珏泉², 决利利^{1*}, 范明松^{3*}

1. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451100

2. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201401

3. 黑龙江全乐制药有限公司, 黑龙江 鸡西 158100

摘要: 目的 制备包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒 (hyperoside self-assembled phosphatidylcholine chitosan nanoparticles, Hyp-PC/CS-NPs), 并考察相对口服吸收生物利用度。方法 单因素考察 Hyp-PC/CS-NPs 制备的主要影响因素, 使用 Box-Behnken 设计-效应面法筛选 Hyp-PC/CS-NPs 处方。透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Hyp-PC/CS-NPs 形貌; 制备 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉并测定其饱和溶解度; 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 研究 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉及各组分的结合机制; X 射线粉末衍射法 (X-ray powder diffraction, XRPD) 分析金丝桃苷晶型; 考察 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉及金丝桃苷原料药的体外释药行为; 测定 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的沉降率并考察其储存稳定性。SD 大鼠分别 ig 给予金丝桃苷原料药和 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉, 考察其口服药动学行为, 并计算 Hyp-PC/CS-NPs 相对口服生物利用度。结果 Hyp-PC/CS-NPs 最佳处方: 药物质量浓度为 0.37 mg/mL, 磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比为 16.3 : 1, 磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比为 7.9 : 1。Hyp-PC/CS-NPs 的包封率、载药量、粒径及 ζ 电位分别为 $(84.19 \pm 1.23) \%$ 、 $(8.81 \pm 0.16) \%$ 、 $(166.18 \pm 4.03) \text{ nm}$ 和 $(32.39 \pm 0.95) \text{ mV}$; Hyp-PC/CS-NPs 外貌为类球形, 金丝桃苷可能与载体发生了氢键络合作用; 金丝桃苷以无定型形态存在于 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉中; 与原料药相比, Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉中的金丝桃苷在模拟胃液、蒸馏水和模拟肠液中的饱和溶解度分别增加了 7.22、4.04、5.10 倍。药动学结果显示, 与金丝桃苷原料药或物理混合物相比, Hyp-PC/CS-NPs 药动学参数均极显著性增加 ($P < 0.01$); Hyp-PC/CS-NPs 中金丝桃苷相对口服生物利用度增加至其原料药的 4.11 倍。结论 成功制备了 Hyp-PC/CS-NPs 及其冻干粉, Hyp-PC/CS-NPs 明显改变了金丝桃苷的体内药动学行为, 显著增加了其口服生物利用度, 为其后续药效学评价奠定实验基础。

关键词: 金丝桃苷; 自组装纳米粒; 磷脂酰胆碱; 壳聚糖; 生物利用度; 药动学; Box-Behnken 设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)03-0819-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.009

Self-assembled phosphatidylcholine/chitosan nanoparticles loaded with hyperoside: Preparation, characterization and oral pharmacokinetics

LIU Yanju¹, WU Yuedan¹, WEI Xiaojie¹, FANG Yuxin¹, LI Juequan², JUE Lili¹, FAN Mingsong³

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451100, China

2. Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China

3. Heilongjiang Chun Lok Pharmaceutical Co., Ltd., Jixi 158100, China

Abstract: Objective To prepare hyperoside self-assembled phosphatidylcholine chitosan nanoparticles (Hyp-PC/CS-NPs), and relative oral bioavailability were studied. **Methods** The main influencing factors of Hyp-PC/CS-NPs were investigated by single factor experiments, Box-Behnken design-response surface method was employed to optimize prescriptions of Hyp-PC/CS-NPs. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe microscopic appearance of Hyp-PC/CS-NPs, lyophilized powder of Hyp-PC/CS-NPs was prepared and its saturated solubility was determined, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used

收稿日期: 2024-08-16

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B310010); 河南省医学教育研究项目 (WJLX2023153); 黑龙江省重点研发计划 (GA22C004)

作者简介: 刘艳菊 (1983—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为临床药学及康复医学。Tel: (0371)62623433 E-mail: Ljiaoxue@163.com

*通信作者: 决利利 (1984—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为药动学与药理学。Tel: (0371)62623433 E-mail: 1473679916@qq.com

范明松 (1973—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为新药工艺及质量控制。Tel: (021)37565589 E-mail: msfan007@163.com

to investigate the binding mechanism of Hyp-PC/CS-NPs lyophilized powder and each component, and crystal form of hyperoside was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD). Drug release behavior *in vitro* of Hyp-PC/CS-NPs lyophilized powder and hyperoside was determined, the sedimentation rate of Hyp-PC/CS-NPs lyophilized powder was determined and its storage stability was also investigated. SD rats were administered intragastrically with hyperoside and Hyp-PC/CS-NPs lyophilized powder, its oral pharmacokinetic behavior was studied, and relative oral bioavailability of Hyp-PC/CS-NPs was calculated. **Results** Optimal formulations of Hyp-PC/CS-NPs: hyperoside concentration was 0.37 mg/mL, phosphatidylcholine to chitosan ratio was 16.3:1, phosphatidylcholine to hyperoside ratio was 7.9:1. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(84.19 \pm 1.23)\%$, $(8.81 \pm 0.16)\%$, (166.18 ± 4.03) nm and (32.39 ± 0.95) mV, respectively. Appearance of Hyp-PC/CS-NPs was spherical, hyperoside may have complexed with the carrier by hydrogen bond. The state of hyperoside changed into an amorphous form in Hyp-PC/CS-NPs freeze-dried powder. Solubility of hyperoside in simulated gastric juice, distilled water and simulated intestinal juice was increased by 7.22, 4.04 and 5.10 times, respectively. Pharmacokinetic results showed that the pharmacokinetic parameters of Hyp-PC/CS-NPs were significantly increased compared with hyperoside or physical mixture ($P < 0.01$), and the relative bioavailability of hyperoside in Hyp-PC/CS-NPs was increased to 4.11 times. **Conclusion** Hyp-PC/CS-NPs and its lyophilized powder were successfully prepared, pharmacokinetic behavior of hyperoside *in vivo* was greatly changed, and bioavailability of hyperoside was significantly increased by Hyp-PC/CS-NPs, which established the experimental foundation for the follow-up pharmacodynamic evaluation.

Key words: hyperoside; self-assembled nanoparticles; phosphatidylcholine; chitosan; bioavailability; pharmacokinetics; Box-Behnken design-response surface method

金丝桃苷属于黄酮醇类成分,在刺五加科、金丝桃科、藤黄科等植物中均可提取得到^[1]。金丝桃苷具有抗肿瘤、预防心脑血管疾病、肾脏保护、降血糖、抗抑郁等活性^[2],该成分的急性毒性试验未见明显异常^[2],安全性良好。本课题组测得金丝桃苷在模拟胃液、蒸馏水和模拟肠液中溶解度分别为 (119.75 ± 2.16) 、 (386.59 ± 3.79) 、 (451.34 ± 4.18) $\mu\text{g/mL}$,属于极微溶解药物。金丝桃苷在体内易受 P-糖蛋白外排影响^[3],且首关效应严重^[4],导致大鼠口服生物利用度仅有 10%^[5]。因此想要推广金丝桃苷在临床上使用,首先应解决其溶解度差及生物利用度低下问题。目前,金丝桃苷有脂质纳米粒^[6-7]、磷脂复合物^[8]、二氧化硅纳米粒^[8]等制剂研究,但脂质纳米粒处方工艺复杂,且含有大量表面活性剂或助表面活性剂,安全性存疑;磷脂复合物黏性大,导致有机溶剂难以除尽,稳定性及溶出度较差,导致成药性不足;二氧化硅纳米粒的载体具有一定毒性^[9],不利于临床推广。

壳聚糖纳米粒系采用交联剂与壳聚糖通过离子交联法、共价交联法等制备的一种纳米级聚集体^[10]。但壳聚糖纳米粒包载疏水性药物的能力有限^[11],导致包封率较低,且常用的交联剂比如戊二醛、甲醛等存在一定毒性,限制了壳聚糖纳米粒在医药领域的应用。磷脂是一种带负电荷的药用辅料,使用安全性高,可与带正电荷的壳聚糖通过静电引力形成自组装纳米粒^[12],且磷脂与疏水性药物亲和性良好^[8],

可使药物包埋于纳米粒内部,从而解决了壳聚糖纳米粒交联剂的毒性及包封率较低的问题。但磷脂是一种混合物(主要成分是磷脂酰胆碱),其杂质成分溶血磷脂酰胆碱存在引发炎症、溶血等风险^[13]。因此,本研究采用磷脂酰胆碱和壳聚糖作为自组装纳米粒的载体^[14-15],制备包载金丝桃苷的磷脂酰胆碱/壳聚糖自组装纳米粒(hyperoside self-assembled phosphatidylcholine-chitosan nanoparticles, Hyp-PC/CS-NPs),首先采用单因素试验确定主要影响因素及其优化范围,进一步采用 Box-Behnken 设计-效应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)精确筛选 Hyp-PC/CS-NPs 处方,并对 Hyp-PC/CS-NPs 中各组分结合机制、金丝桃苷晶型状态等进行研究;考察 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉在模拟胃、肠液中的释药行为及其大鼠口服药动学行为,期望通过本研究为金丝桃苷新型纳米制剂研究提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MSE125P-CE 型分析天平,德国 Sartorius 仪器公司;Agilent 1200 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Acquity 型超高效液相色谱仪、Xevo TQD 三重四极杆质谱仪,美国 Waters 公司;SM27 型磁力搅拌器,上海默西科学仪器有限公司;F440 型超低温冰箱,德国艾本德股份有限公司;DHC-16500 型高速离心机,澳大利亚 Kewlab 公司;JEM-2100 型

透射电子显微镜,日本电子株式会社;APD-2000 型 X 粉末衍射仪,北京利曼科技有限公司;FT/IR-6000 型傅里叶变换红外光谱仪,日本 Jasco 公司;AT612 型溶出仪,上海卓光仪器科技有限公司;Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪,英国马尔文公司;FD-1A50 型真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;LHS-150SC 型恒温恒湿箱,上海康路仪器设备有限公司。

1.2 试药

对照品金丝桃苷(批号 nkl-00045230812,质量分数 99.0%)、大豆苷(批号 nkl-000156658,质量分数 99.1%),成都纳柯锂生物科技有限公司;金丝桃苷原料药,批号 20210701,质量分数 97.5%,南京卡塞斯医药科技有限公司;磷脂酰胆碱,批号 20201211,质量分数 98.0%,上海辅必成医药科技有限公司;壳聚糖,批号 20210523,潍坊科海甲壳素有限公司;光谱纯溴化钾,批号 20240111,上海安谱实验科技股份有限公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),批号 20220513,国药集团化学试剂有限公司;模拟胃液(批号 20231022)、模拟肠液(批号 20231015),南京亿迅生物科技有限公司。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠购自河南省动物实验中心,许可证编号:SCXK-2020-0001,雌雄各半,实验室饲养至体质量为 (220 ± 20) g。所有动物实验均遵循郑州工业应用技术学院有关实验动物管理和使用的规定,实验动物伦理批准号为 20240326,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 Hyp-PC/CS-NPs 的制备

取金丝桃苷原料药 20 mg,溶于 5 mL 无水乙醇,加入处方量磷脂酰胆碱,溶解澄清得有机相。取处方量的壳聚糖溶于一定 pH 值的醋酸水溶液中,即得水相,置于 55 °C 水浴中,于 600 r/min 转速下磁力搅拌。将溶有金丝桃苷和磷脂酰胆碱的有机相滴加至水相中,持续磁力搅拌 1 h,置于 55 °C 水浴中减压旋蒸 0.5 h,采用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,续滤液即为 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液。不含金丝桃苷的阴性样品同法制备。

2.2 Hyp-PC/CS-NPs 中金丝桃苷定量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相为 0.5%甲酸水溶液-乙腈(70:30);检测波长为 360 nm;体积流量为

1.0 mL/min;柱温为 30 °C;进样体积为 10 μ L;理论塔板数以金丝桃苷峰计不低于 5 000。

2.2.2 线性关系考察 精密称取金丝桃苷对照品,采用乙腈配制成质量浓度为 0.2 mg/mL,作为对照品储备液。精密取金丝桃苷对照品储备液,加入乙腈稀释配制成 10.00、5.00、1.00、0.10、0.05 μ g/mL 系列金丝桃苷对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录各质量浓度(X)金丝桃苷的峰面积(Y),进行线性回归得回归方程 $Y=33.85 X+1.09$, $r=0.9994$,结果表明金丝桃苷在 0.05~10.00 μ g/mL 线性关系良好。

2.2.3 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液的制备 精密吸取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶中,加 30 mL 无水乙醇,超声 5 min(功率 250 W、频率 40 kHz),放冷,加无水乙醇稀释定容;精密吸取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加流动相稀释定容,即得 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取“2.1”项下阴性样品,按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液。另取 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液和金丝桃苷对照品溶液(1.00 μ g/mL),按“2.2.1”项下色谱条件进行检测,结果见图 1。结果表明金丝桃苷色谱峰无杂质干扰,专属性好。

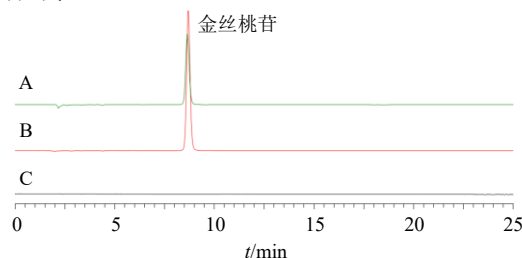


图 1 Hyp-PC/CS-NPs 样品(A)、金丝桃苷对照品(B)和阴性样品(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Hyp-PC/CS-NPs sample (A), hyperoside reference substance (B) and negative sample (C)

2.2.5 精密度考察 取 0.05、1.00、10.00 μ g/mL 金丝桃苷对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续测定 6 次,记录金丝桃苷峰面积,结果其 RSD 分别为 0.84%、0.36%、0.30%,表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液,置于 HPLC 的温控进样盘(温度 25 °C)中,分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录金丝桃苷峰面积,结果其 RSD 为 1.17%,表明 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取同一份 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液,按“2.2.3”项下方法制备 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液 6 份,按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录金丝桃苷峰面积,计算其质量分数的 RSD 为 1.56%,结果表明该实验重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 分别精密吸取 0.5 mL Hyp-PC/CS-NPs 混悬液至 9 个 50 mL 量瓶中,分成低、中、高 3 组,分别加入质量浓度为 0.2 mg/mL 的金丝桃苷储备液 0.25 mL (低)、0.50 mL (中)和 0.75 mL (高),继续按“2.2.3”项下方法制备 Hyp-PC/CS-NPs 供试品溶液,并测定金丝桃苷总量,计算得金丝桃苷的平均加样回收率为 101.32%,RSD 为 1.79%,表明该方法可用于测定 Hyp-PC/CS-NPs 中金丝桃苷含量。

2.3 Hyp-PC/CS-NPs 粒径、 ζ 电位、包封率和载药量测定

精密吸取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 1 mL (经 0.45 μm 微孔滤膜滤过),置于超滤管 (截取相对分子质量为 10 000) 中,8 500 r/min 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 离心半径 6.8 cm) 5 min,超滤管内截留的即为载药纳米粒,加入溶剂 (无水乙醇-1%乙酸水溶液 1:1) 使金丝桃苷完全释放,测定被包封的金丝桃苷的质量 ($M_{\text{包封}}$),计算 Hyp-PC/CS-NPs 中金丝桃苷的包封率。取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液直接冻干,称定质量 ($M_{\text{总质量}}$),计算 Hyp-PC/CS-NPs 中金丝桃苷的载药量。取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 0.1 mL 加至 5 mL 纯化水中,摇匀,取适量测定纳米粒粒径和分散指数 (polydispersity index, PDI)。另取适量装样至 ζ 电位专用电槽中,测定 Hyp-PC/CS-NPs 的 ζ 电位。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封}} / M_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封}} / M_{\text{总质量}}$$

2.4 单因素考察 Hyp-PC/CS-NPs 处方

2.4.1 药物质量浓度的考察 固定磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比为 15:1,磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比为 8:1,水相 pH 值为 3.0 条件下考察药物质量浓度对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响,结果见表 1。随着药物质量浓度的增加,Hyp-PC/CS-NPs 的包封率和载药量呈先增大后下降情况,可能是药物质量浓度较小时水相体积较大,从而使 Hyp-PC/CS-NPs 更大程度地暴露在水相环境中,增加了药物泄露概率^[16];药物质量浓度较大时水相体积较小,影响了磷脂酰胆碱水化程度及载体之间的静电结合^[14],从而影响了 Hyp-PC/CS-

表 1 药物质量浓度对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of drug mass concentration on encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of Hyp-PC/CS-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
0.2	72.64 $\pm$ 1.40	7.59 $\pm$ 0.19	153.61 $\pm$ 7.62	29.64 $\pm$ 1.36
0.3	74.19 $\pm$ 0.92	7.72 $\pm$ 0.10	158.79 $\pm$ 8.44	30.17 $\pm$ 0.89
0.4	80.53 $\pm$ 1.07	8.44 $\pm$ 0.13	163.04 $\pm$ 9.02	32.45 $\pm$ 1.22
0.5	73.03 $\pm$ 0.89	7.51 $\pm$ 0.17	186.97 $\pm$ 8.43	30.77 $\pm$ 0.95
0.6	71.79 $\pm$ 0.92	7.26 $\pm$ 0.18	189.07 $\pm$ 10.12	31.14 $\pm$ 1.26

NPs 载药。Hyp-PC/CS-NPs 粒径随着药物质量浓度的增加而增大,但药物质量浓度对 ζ 电位影响相对较小。当药物质量浓度为 0.4 mg/mL 时 Hyp-PC/CS-NPs 包封率和载药量相对较大,且 ζ 电位大于 30 mV,综合考虑各指标情况,后续对药物质量浓度 0.3~0.5 mg/mL 进行优化。

2.4.2 磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比的考察 固定药物质量浓度为 0.4 mg/mL,磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比为 8:1,水相 pH 值为 3.0 条件下考察磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响,结果见表 2。随着磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比的增加,Hyp-PC/CS-NPs 包封率和载药量呈先增加后下降趋势,说明合适的磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比利于载药^[14]。Hyp-PC/CS-NPs 粒径总体呈下降趋势,这是由于磷脂酰胆碱具有较高的乳化能力,可降低体系界面张力^[14-15]。磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比大于 20:1 时,Hyp-PC/CS-NPs 的 ζ 电位低于 30 mV,这可能是由于 Hyp-PC/CS-NPs 表面正电荷主要由壳聚糖提供,当壳聚糖用量过小时,导致 Hyp-PC/CS-NPs 表面正电荷密度减少^[16],从而使其 ζ 电位降低。可见,磷脂酰胆碱

表 2 磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of phosphatidylcholine to chitosan ratio on encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of Hyp-PC/CS-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂酰胆碱与 壳聚糖质量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
5:1	71.14 $\pm$ 1.19	6.56 $\pm$ 0.14	251.74 $\pm$ 12.14	33.49 $\pm$ 1.89
10:1	73.96 $\pm$ 1.27	7.37 $\pm$ 0.09	220.57 $\pm$ 9.66	32.04 $\pm$ 1.66
15:1	82.71 $\pm$ 1.06	8.76 $\pm$ 0.12	170.12 $\pm$ 7.42	32.17 $\pm$ 1.71
20:1	74.42 $\pm$ 0.96	7.71 $\pm$ 0.16	164.31 $\pm$ 7.59	28.16 $\pm$ 1.20
25:1	70.55 $\pm$ 1.10	7.51 $\pm$ 0.13	165.84 $\pm$ 6.76	25.48 $\pm$ 0.93

碱与壳聚糖质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 影响较大, 综合考虑各指标情况, 后续选择两者质量比 10:1~20:1 进行优化。

2.4.3 磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比的考察 固定药物质量浓度为 0.4 mg/mL, 磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比为 15:1, 水相 pH 值为 3.0 条件下考察磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 3。随着磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比的增加, Hyp-PC/CS-NPs 包封率逐渐增加后趋稳, 可见适度增加磷脂酰胆碱用量利于增加该纳米粒包封率, 但达到一定程度后并不能使包封率进一步增加, 反而会使载药量明显下降。Hyp-PC/CS-NPs 粒径呈先下降后增大趋势, 可能是磷脂酰胆碱用量较大时, 导致 Hyp-PC/CS-NPs 容易聚集^[15], 使其粒径增大; 磷脂酰胆碱用量较少时, 体系稳定作用较弱^[14-15], 导致该纳米粒粒径增长。不同磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比对 ζ 电位影响较小^[12], 可见磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 影响较大, 综合考虑各指标情况, 后续对两者质量比 6:1~10:1 继续优化。

表 3 磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of phosphatidylcholine to hyperoside ratio on encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of Hyp-PC/CS-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
4:1	70.19 $\pm$ 1.14	13.01 $\pm$ 0.29	266.14 $\pm$ 14.64	30.53 $\pm$ 1.87
6:1	74.54 $\pm$ 0.98	9.96 $\pm$ 0.13	213.89 $\pm$ 10.27	29.67 $\pm$ 0.99
8:1	82.25 $\pm$ 1.09	8.50 $\pm$ 0.20	168.46 $\pm$ 9.58	31.57 $\pm$ 0.86
10:1	82.10 $\pm$ 1.23	7.00 $\pm$ 0.11	186.90 $\pm$ 7.49	30.95 $\pm$ 1.19
12:1	82.63 $\pm$ 0.91	6.41 $\pm$ 0.17	211.43 $\pm$ 7.98	28.85 $\pm$ 1.30

2.4.4 水相 pH 值的考察 固定药物质量浓度为 0.4 mg/mL, 磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比为 15:1, 磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比为 8:1 条件下考察水相 pH 值对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 4。随着水相 pH 值的升高 Hyp-PC/CS-NPs 包封率和载药量均逐渐下降, 可能是金丝桃苷溶解度随着 pH 值升高而逐渐增大^[5], 药物易进入水相, 从而影响了 Hyp-PC/CS-NPs 载药。 ζ 电位随着 pH 值升高而降低, 可能是 pH 值越高, 壳聚糖电离出的 NH^+ 电荷密度越低^[17-18], 进而导致 Hyp-PC/CS-NPs 的 ζ 电位逐渐下降。由于过低

表 4 水相 pH 值对 Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of pH value of aqueous phase on encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of Hyp-PC/CS-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水相 pH 值	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
2.5	83.09 $\pm$ 1.46	8.72 $\pm$ 0.19	162.64 $\pm$ 7.55	32.79 $\pm$ 1.03
3.0	81.81 $\pm$ 1.03	8.61 $\pm$ 0.17	168.62 $\pm$ 8.34	33.41 $\pm$ 1.57
3.5	70.68 $\pm$ 1.27	7.42 $\pm$ 0.12	187.24 $\pm$ 8.18	25.09 $\pm$ 1.08
4.0	62.47 $\pm$ 0.98	6.48 $\pm$ 0.14	183.65 $\pm$ 7.96	22.13 $\pm$ 0.97

的 pH 值可能影响磷脂酰胆碱的稳定性, 故最终确定水相 pH 值为 2.5。

2.5 BBD-RSM 优化 Hyp-PC/CS-NPs 处方

2.5.1 优化方案 Hyp-PC/CS-NPs 处方单因素考察时发现药物质量浓度、磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比、磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比对 Hyp-PC/CS-NPs 影响较大, 分别设置为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 根据“2.4”项下单因素考察结果, 各自变量水平设置见表 5。Hyp-PC/CS-NPs 包封率、载药量、粒径分别作为因变量 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 , 为了从总体上对 Hyp-PC/CS-NPs 进行质量控制, 将这 3 个指标转换为总评归一值 (overall desirability, OD), 采用 OD 值作为综合指标筛选 Hyp-PC/CS-NPs 处方。OD 值计算过程: 包封率 (d_1) 和载药量 (d_2) 计算公式为 $d_{1 \text{ 或 } 2} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$, M_i 、 $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别代表该组试验中某指标实际测量值、最大值和最小值; 粒径 (d_3) 计算公式为 $d_3 = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$; 则 $\text{OD} = (d_1 d_2 d_3)^{1/3}$ 。各组试验的包封率、载药量、粒径测定结果和 OD 值计算结果见表 5。

2.5.2 模型拟合及方差分析 采用 Design Expert V10.0.3 软件对表 5 中各试验的 OD 值进行模型拟合, 得拟合方程: $\text{OD} = 0.80 - 0.09 X_1 + 0.13 X_2 - 0.05 X_3 + 0.08 X_1 X_2 - 0.06 X_1 X_3 - 0.04 X_2 X_3 - 0.13 X_1^2 - 0.23 X_2^2 - 0.44 X_3^2$ 。方差分析结果见表 6, 可见模型 $P < 0.0001$, 表明建立的数学模型具有显著性意义; 模型判定系数 $R^2 = 0.9957$, 表明 99.57% 的数据可用该数学模型进行解释, 调整判定系数 $R_{\text{adj}}^2 = 0.9902$, 表明只存在 0.98% 的变异情况; 失拟项 $P = 0.0838 > 0.05$, 干扰因素无显著性影响, 表明建立的 OD 值数学模型可用于 Hyp-PC/CS-NPs 处方研究, 可信度较高。数学模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异 ($P < 0.01$), $X_2 X_3$ 具有

表 5 BBD-RSM 试验设计与结果 ($n=3$)Table 5 Experiments design and results of BBD-RSM ($n=3$)

试验号	$X_1/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD 值	试验号	$X_1/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD 值
1	0.4 (0)	20 : 1 (+1)	6 : 1 (-1)	71.56	10.07	212.08	0.347	10	0.4	10 : 1	10 : 1	78.74	6.54	215.39	0.000
2	0.4	15 : 1 (0)	8 : 1 (0)	83.67	8.71	168.71	0.798	11	0.3 (-1)	20 : 1	8 : 1	76.45	8.42	177.14	0.571
3	0.4	15 : 1	8 : 1	81.91	8.86	160.83	0.807	12	0.4	15 : 1	8 : 1	84.13	8.85	165.62	0.835
4	0.5 (+1)	15 : 1	10 : 1 (+1)	78.19	6.72	241.78	0.000	13	0.3	10 : 1	8 : 1	75.44	7.31	184.06	0.444
5	0.5	15 : 1	6 : 1	74.27	10.17	237.42	0.253	14	0.3	15 : 1	6 : 1	74.55	8.19	218.21	0.348
6	0.4	15 : 1	8 : 1	84.53	8.67	171.29	0.799	15	0.5	10 : 1	8 : 1	73.81	7.48	236.93	0.161
7	0.4	10 : 1 (-1)	6 : 1	69.84	9.13	218.64	0.000	16	0.3	15 : 1	10 : 1	77.68	7.08	200.22	0.344
8	0.4	15 : 1	8 : 1	82.98	8.66	166.92	0.784	17	0.5	20 : 1	8 : 1	76.06	8.62	172.77	0.591
9	0.4	20 : 1	10 : 1	79.82	6.89	235.41	0.172								

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.49	9	0.17	181.44	<0.000 1	X_1^2	0.07	1	0.07	75.82	<0.000 1
X_1	0.07	1	0.07	67.60	<0.000 1	X_2^2	0.23	1	0.23	254.53	<0.000 1
X_2	0.14	1	0.14	158.96	<0.000 1	X_3^2	0.82	1	0.82	894.75	<0.000 1
X_3	0.02	1	0.02	25.61	0.001 5	残差	6.38×10^{-3}	7	9.11×10^{-4}		
X_1X_2	0.02	1	0.02	25.24	0.001 5	失拟项	4.98×10^{-3}	3	1.66×10^{-3}	4.73	0.083 8
X_1X_3	0.02	1	0.02	16.95	0.004 5	纯偏差	1.40×10^{-3}	4	3.51×10^{-4}		
X_2X_3	7.59×10^{-3}	1	7.59×10^{-3}	8.33	0.023 5	总离差	1.49	16			

显著性差异 ($P<0.05$)。

2.5.3 效应面优化及处方确定 根据建立的 OD 值数学模型,采用 Design Expert V10.0.3 软件绘制 OD 值与自变量的效应面图,结果见图 2。设置 OD 值为望大值,区间设置为 0~1,得 Hyp-PC/CS-NPs 最佳处方:药物质量浓度为 0.37 mg/mL (根据药物质

量浓度确定水相体积为 54 mL),磷脂酰胆碱与壳聚糖质量比为 16.3 : 1,磷脂酰胆碱与金丝桃苷质量比为 7.9 : 1,预测 OD 值为 0.839。

2.6 Hyp-PC/CS-NPs 处方验证

按“2.5.3”项下确定的最佳处方平行制备 3 批 Hyp-PC/CS-NPs,测定包封率、载药量和粒径,计算

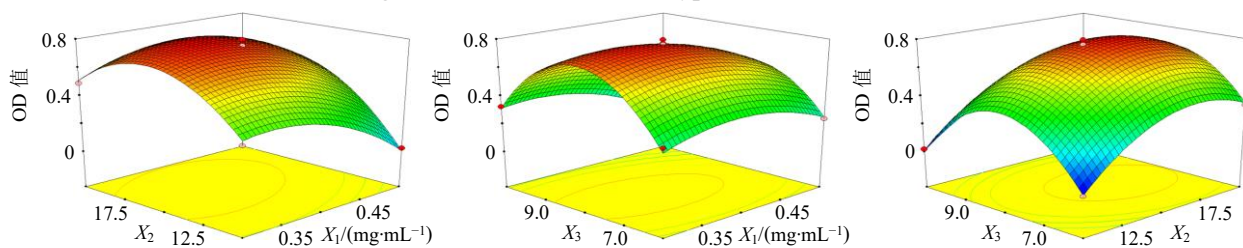


图 2 各因素对 OD 值的效应面图

Fig. 2 Response surface of every factor on OD value

实测 OD 值,以预测 OD 值 (0.839) 为参考计算实测 OD 值的相对偏差 [相对偏差=(实际值-预测值)/预测值],结果见表 7。OD 值相对偏差为 -1.19%,表明建立的 OD 值数学模型具有较高的指导意义。

包封率、载药量和粒径均值分别为 (84.19 ± 1.23) %、(8.81 ± 0.16) %和 (166.18 ± 4.03) nm,另测得 Hyp-PC/CS-NPs 的 PDI 为 0.086 ± 0.007 , ζ

电位为 (32.39 ± 0.95) mV。Hyp-PC/CS-NPs 的粒径分布见图 3-A, ζ 电位见图 3-B。

2.7 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Hyp-PC/CS-NPs 外貌

取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 0.1 mL 加至 5 mL 纯化水中,摇匀,取适量涂敷在铜网上 (无水乙醇冲洗 3 遍后晾干),1.0%磷钨酸钠染色,晾干。置于

TEM 下,放大倍数至 13 000 进行观察。Hyp-PC/CS-NPs 外貌见图 4, 形状为类球形。

表 7 Hyp-PC/CS-NPs 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 7 Results of Hyp-PC/CS-NPs prescription validation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	OD 值	OD 均值	相对偏差/%
1	85.55	8.98	170.84	0.825		
2	83.86	8.66	163.81	0.829	0.829±0.040	-1.19
3	83.16	8.78	163.90	0.833		

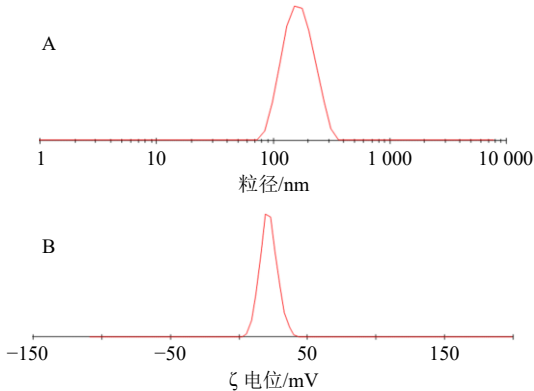


图 3 Hyp-PC/CS-NPs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)
 Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Hyp-PC/CS-NPs

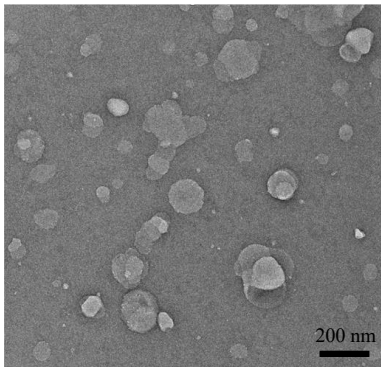


图 4 Hyp-PC/CS-NPs 的 TEM 图
 Fig. 4 TEM picture of Hyp-PC/CS-NPs

2.8 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的制备及溶解度测定
2.8.1 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的制备 前期考察发现,当甘露醇质量分数为 5%时制得冻干粉色泽均一,无塌陷现象,因此选择甘露醇质量分数为 5%来制备 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉。取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 10 mL, 18 000 r/min 离心 45 min (离心半径 6.8 cm), 弃去水相,加入 10 mL 蒸馏水重悬。加入冻干保护剂甘露醇至其质量分数为 5%,震荡溶解,按 3 mL/瓶分装至西林瓶中,置于-40 ℃冰箱中预冻 3 d,立即置于冻干机中抽真空进行冻干(真空度

10 Pa), 3 d 后取出,即得 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉。Hyp-PC/CS-NPs 混悬液、Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉及其复溶后样品外观见图 5。

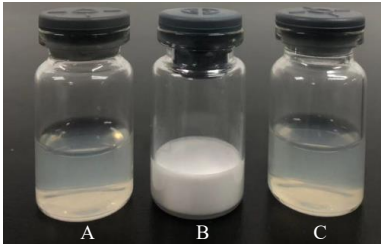


图 5 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 (A)、冻干粉 (B) 及其复溶后样品 (C) 的外观
 Fig. 5 Appearance of Hyp-PC/CS-NPs suspension (A), lyophilized powder (B) and redissolved sample (C)

测得复溶后 Hyp-PC/CS-NPs 的包封率、粒径、PDI 和 ζ 电位分别为 (81.22 ± 1.29) %、(175.74 ± 7.11) nm、 0.092 ± 0.009 和 (31.17 ± 1.14) mV,可见包封率和 ζ 电位有所下降,粒径和 PDI 值有所增大。另外测得 pH 值为 6.82 ± 0.08 。

2.8.2 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉溶解度的测定 取过量金丝桃苷原料药、Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉和物理混合物(金丝桃苷原料药与辅料比例同 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉,仅作简单混合),分别置于模拟胃液(含胃蛋白酶质量浓度为 3.2 g/L, pH 2.0)中,超声 10 min,此时各组样品混悬液底部均有药物沉淀。置于 25 ℃水浴中,600 r/min 磁力搅拌 2 d, 12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 10 min,分别测定上清液中金丝桃苷质量浓度,即为其溶解度。同法测定 3 个样品在蒸馏水和模拟肠液(含质量浓度为 8.0 g/L 胰蛋白酶, pH 7.4)中的溶解度。结果见表 8,金丝桃苷在物理混合物中的溶解度均高于其原料药,可能与处方中磷脂酰胆碱等辅料的增溶作用有关^[13]。Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉使金丝桃苷在模拟胃液、蒸馏水和模拟肠液中的溶解度比其原料药分别增加了

表 8 金丝桃苷原料药、物理混合物、Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的溶解度测定结果 (25 ℃, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Solubility determination results of hyperoside bulk drug, physical mixture and Hyp-PC/CS-NPs freeze-dried powder (25 ℃, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

介质	溶解度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	金丝桃苷原料药	物理混合物	Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉
模拟胃液	119.75±2.16	136.84±1.90	984.16±5.94
蒸馏水	386.59±3.79	410.77±2.63	1 947.89±8.65
模拟肠液	451.34±4.18	498.10±3.76	2 751.48±19.18

7.22、4.04、5.10 倍。

2.9 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析

取 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液 10 mL, 除不加冻干保护剂外按“2.8.1”项下方法操作, 制备 Hyp-PC/CS-NPs 直接冻干粉。取金丝桃苷原料药、磷脂酰胆碱、壳聚糖、物理混合物 (金丝桃苷与辅料比例同 Hyp-PC/CS-NPs) 和 Hyp-PC/CS-NPs 直接冻干粉适量, 分别与溴化钾按质量比 1:100 研磨均匀, 压片后立即测试。

FT-IR 测试条件: 光阑为 100.0, 背景和样品扫描次数为 16 次, 分辨率为 4.0。结果见图 6, 壳聚糖在 $1\,652.60\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰属于 -NH_2 峰, 在物理混合物中该峰基本未变 ($1\,652.58\text{ cm}^{-1}$), 但在 Hyp-PC/CS-NPs 的 FT-IR 图谱中移动至 $1\,649.90\text{ cm}^{-1}$ 。磷脂酰胆碱在 $1\,053.55\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰由 PO_2^- 伸缩震荡引起, 而在物理混合物中该峰基本未变 ($1\,053.52\text{ cm}^{-1}$), 但在 Hyp-PC/CS-NPs 的 FT-IR 图谱中移动至 $1\,056.12\text{ cm}^{-1}$, 推测壳聚糖- NH_2 可能与磷脂酰胆碱的 PO_2^- 发生了静电作用。在金丝桃苷原料药的 FT-IR 图谱中, $3\,256.82\text{ cm}^{-1}$ 处宽峰由 -OH 伸缩振动引起, 在物理混合物中该峰未发生明显变化 (可能与壳聚糖- OH 伸缩振动重叠), 但在 Hyp-PC/CS-NPs FT-IR 图谱中有明显的改变, 表明金丝桃苷结构上 -OH 可能与载体发生了氢键等络合作用。同时也证明了 Hyp-PC/CS-NPs 是一种不同于物理混合物的载药体系。

2.10 晶型分析

X 射线粉末衍射法 (X-ray powder diffraction,

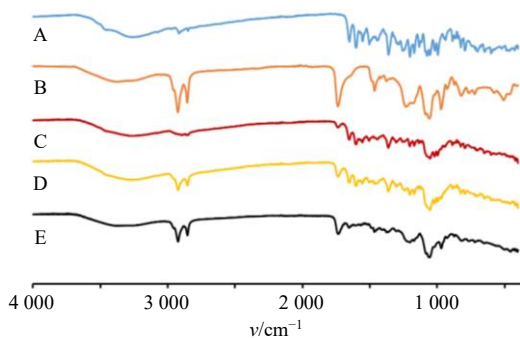


图 6 金丝桃苷原料药 (A)、磷脂酰胆碱 (B)、壳聚糖 (C)、物理混合物 (D)、Hyp-PC/CS-NPs 直接冻干粉样品 (E) 的 FT-IR 图

Fig. 6 FT-IR of hyperoside bulk drug (A), phosphatidylcholine (B), chitosan (C), physical mixture (D), Hyp-PC/CS-NPs direct freeze-dried powder samples (E)

XRPD) 扫描条件: Cu-K α 靶, 扫描速率为 $4^\circ/\text{min}$ 。取金丝桃苷原料药、磷脂酰胆碱、壳聚糖、甘露醇、“2.8.2”项下的物理混合物和 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉适量, 进行 XRPD 扫描, 结果见图 7。金丝桃苷原料药在 7.2° 、 8.7° 、 12.3° 、 19.2° 和 25.3° 等处衍射峰最强, 在物理混合物 XRPD 图谱中仍可见 (箭头所示), 但强度有所下降, 表明金丝桃苷在物理混合物中晶型未发生改变; 但在 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉 XRPD 图谱中, 金丝桃苷特征衍射峰均消失, 表明金丝桃苷可能转变为无定型形态。

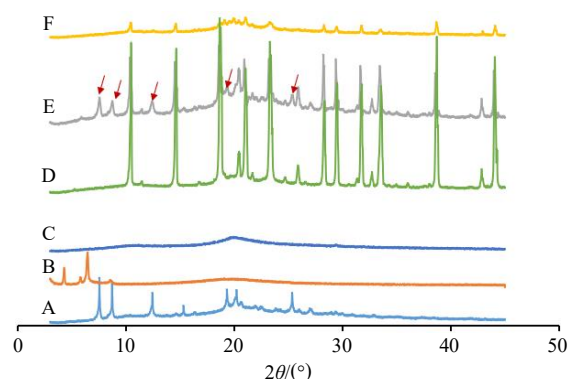


图 7 金丝桃苷原料药 (A)、磷脂酰胆碱 (B)、壳聚糖 (C)、甘露醇 (D)、物理混合物 (E)、Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉样品 (F) 的 XRPD 结果

Fig. 7 XRPD results of hyperoside bulk drug (A), phosphatidylcholine (B), chitosan (C), mannitol (D), physical mixture (E), Hyp-PC/CS-NPs freeze-dried powder samples (F)

2.11 体外释药行为研究及模型拟合

取金丝桃苷原料药和 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉适量 (使金丝桃苷质量均为 25 mg), 分别加入 5 mL 模拟胃液 (含胃蛋白酶质量浓度为 3.2 g/L , $\text{pH } 2.0$) 制备混悬液, 并密封于透析袋 (截留相对分子质量 $8\,000\sim 14\,000$) 中。取 1 000 mL 模拟胃液作为释药介质, 介质恒温 (37.0 ± 0.2) $^\circ\text{C}$, 转速为 75 r/min, 取样点设置为 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12 h, 各点取样 5 mL 后立即补加 5 mL 同温空白释药介质, 12 500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 10 min, 测定金丝桃苷含量, 计算各时间点的累积释放率, 绘制释放曲线。同法考察各样品在模拟肠液 (含胰蛋白酶质量浓度为 8.0 g/L , $\text{pH } 7.4$) 中的释药行为, 结果见图 8。金丝桃苷原料药在模拟胃液中 4 h 后累积释放率出现逐渐下降情况, 而在模拟肠液中累积释放率未见下降情况。Hyp-PC/CS-NPs 使金丝桃苷在模拟胃液和模拟肠液中累积释放率均得到明

显增加。释药模型拟合结果见表 9, 据 R^2 大小判断, Hyp-PC/CS-NPs 在 2 种释药介质中的释药行为与 Weibull 模型拟合度最高, 说明释药过程含快速释药期和缓慢释药期。另外, 金丝桃苷原料药在模拟肠液中释药行为与 Weibull 模型拟合度最高, 释药方程为 $\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.5679 \ln t-1.6351$, $R^2=0.9316$ 。但金丝桃苷原料药在模拟胃液释药行为与一级、Higuchi、Weibull 模型拟合相关系数 R^2 均小于 0.4, 故不再进行拟合。

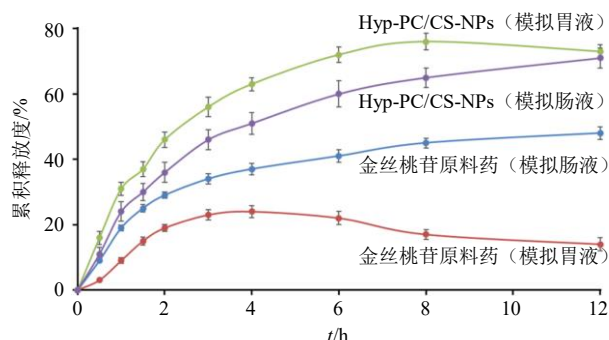


图 8 金丝桃苷原料药和 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉在模拟胃、肠液中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 8 Release profiles *in vitro* of hyperoside bulk drug and Hyp-PC/CS-NPs freeze-dried powder in simulate gastrointestinal fluid ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 9 Hyp-PC/CS-NPs 释药模型拟合结果

Table 9 Fitting release model of Hyp-PC/CS-NPs

介质	模型	拟合方程	R^2
模拟胃液	一级释药	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.0371t+0.2715$	0.6192
	Higuchi	$M_t/M_\infty=0.1970t^{1/2}+0.0849$	0.8546
	Weibull	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.7003\ln t-1.3004$	0.9033
模拟肠液	一级释药	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.0415t+0.2378$	0.7121
	Higuchi	$M_t/M_\infty=0.2528t^{1/2}+0.0051$	0.9360
	Weibull	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.8269\ln t-1.3773$	0.9658

t 代表时间, M_t 和 M_∞ 分别为 t 和 ∞ 时的累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放率。

t is time, M_t and M_∞ are accumulative drug-release at time t and ∞ , M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t .

2.12 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的沉降率测定及稳定性考察

取 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉复溶, 过 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 测定续滤液中金丝桃苷的质量 (M_t), 与新制备 Hyp-PC/CS-NPs 混悬液中金丝桃苷质量 (M_0) 相比, 计算 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的沉降率。

$$\text{沉降率}=(M_0-M_t)/M_0$$

取 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉 (西林瓶密封) 放置于温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度 65% 的恒温恒湿箱中, 分

别于放置 0、1、2、3、6 个月取样测定沉降率、包封率、粒径、PDI 和 ζ 电位, 结果见表 10。加速条件下放置 6 个月后, Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉沉降率小于 1.5%, 包封率大于 80%, 粒径仍在 200 nm 以下, PDI 小于 0.100, ζ 电位仍大于 30 mV , 表明 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉稳定性良好。

表 10 Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉的稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Results of stability study of Hyp-PC/CS-NPs freeze-dried powder ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$t/\text{月}$	沉降率/%	包封率/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
0	0.84 ± 0.07	82.04 ± 1.20	178.44 ± 6.92	0.089 ± 0.007	32.03 ± 1.12
1	0.90 ± 0.08	82.71 ± 1.04	174.84 ± 5.63	0.085 ± 0.009	31.64 ± 0.89
2	0.93 ± 0.12	81.84 ± 1.33	179.29 ± 7.26	0.093 ± 0.005	31.93 ± 1.40
3	1.04 ± 0.13	81.58 ± 0.90	182.60 ± 6.78	0.084 ± 0.008	32.13 ± 1.37
6	1.38 ± 0.17	81.05 ± 1.17	186.77 ± 7.44	0.095 ± 0.010	31.86 ± 1.24

2.13 口服药动力学研究

2.13.1 色谱及质谱条件 流动相为 0.5% 甲酸水溶液-乙腈 (80:20); 体积流量为 0.2 mL/min ; 色谱柱为 Diamo Leapsil C_{18} 柱 ($50\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $1.9\mu\text{m}$); 柱温为 $30\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量为 $5\mu\text{L}$ 。使用 ESI 负离子模式, 多反应监测模式进行检测, 电离源温度为 $150\text{ }^\circ\text{C}$, 毛细管电压为 $2\text{ }500\text{ V}$, 气帘气压力为 206.843 kPa (30 psi)。金丝桃苷和大豆苷的锥孔电压分别为 32、39 V, 碰撞能量分别为 25、46 eV, 检测离子对分别为 $m/z\ 462.94 \rightarrow 299.91$ (金丝桃苷) 和 $m/z\ 414.91 \rightarrow 252.01$ (大豆苷)。

2.13.2 给药及采血方案 采用 0.5% CMC-Na 水溶液分别配制金丝桃苷原料药、“2.8.2”项下的物理混合物和 Hyp-PC/CS-NPs 的 ig 混悬液, 金丝桃苷质量浓度均为 2.5 mg/mL 。取 SD 大鼠 18 只 (实验室环境适应 7 d), 随机分成 3 组, 分别称定质量, 按 25 mg/kg (以金丝桃苷含量计) 剂量进行 ig。分别于 0、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 将待采血大鼠置于盛有乙醚密闭容器中, 麻醉 10 s 后立即采用毛细玻璃管 (肝素浸润) 于眼眶后静脉丛采血 $200\mu\text{L}$, $2\text{ }500\text{ r/min}$ 离心 (防止溶血, 离心半径 6.8 cm) 2 min, 取上层血浆至空白离心管中, 即得血浆样品, 密封后置 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存, 备用。

2.13.3 血浆样品处理 精密称取大豆苷对照品, 采用乙腈配制成质量浓度为 $1.000\mu\text{g/mL}$, 作为血浆样品的内标溶液。精密吸取 $50\mu\text{L}$ 血浆样品 ($37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴解冻) 至离心管中, 加入内标溶液 $25\mu\text{L}$ 和乙

睛 1.0 mL, 密封涡旋 5 min, 置于高速离心机中以 8 000 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 5 min。收集上层有机相于 37 °C 的 N₂ 流下吹干, 加 50 μ L 0.5% 甲酸水溶液-乙腈 (70:30) 混合溶剂涡旋复溶, 再次 8 000 r/min 离心 5 min, 即得血浆样品溶液。

2.13.4 线性关系考察 取健康 SD 大鼠 1 只, 置于盛有乙醚密闭容器中, 麻醉 10 s 后心脏取血至肝素浸润的离心管中, 2 500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 2 min, 取上层血浆至空白离心管中, 即得空白血浆。采用空白血浆配制质量浓度分别为 1 400.00、700.00、350.00、70.00、35.00、11.67 ng/mL 的金丝桃苷血浆对照品, 按“2.13.3”项下方法操作制备含大豆苷内标的血浆对照品溶液, 并按“2.13.1”项下色谱及质谱条件进行检测。以金丝桃苷色谱峰与大豆苷内标峰面积比 (Y) 对金丝桃苷质量浓度 (X) 进行线性回归, 得到回归方程 $Y=0.0658X+0.0276$, $r=0.9987$, 结果表明金丝桃苷线性范围为 11.67~1 400.00 ng/mL。

2.13.5 专属性考察 取空白血浆样品按“2.13.3”项下处理即得空白血浆样品溶液。取空白血浆样品溶液、金丝桃苷血浆对照品溶液 (含大豆苷内标) 和 Hyp-PC/CS-NPs ig 给药 0.5 h 后的血浆样品溶液, 分别按“2.13.1”项下色谱及质谱条件进样测定, 结果见图 9。血浆样品溶液中金丝桃苷和大豆苷保留时间与血浆对照品溶液中一致, 无其他杂质干扰, 专属性较高。

2.13.6 精密度的考察 取含金丝桃苷 11.67 ng/mL (低)、350.00 ng/mL (中) 和 1 400.00 ng/mL (高) 的血浆对照品溶液 (含大豆苷内标), 同 1 d 内分别

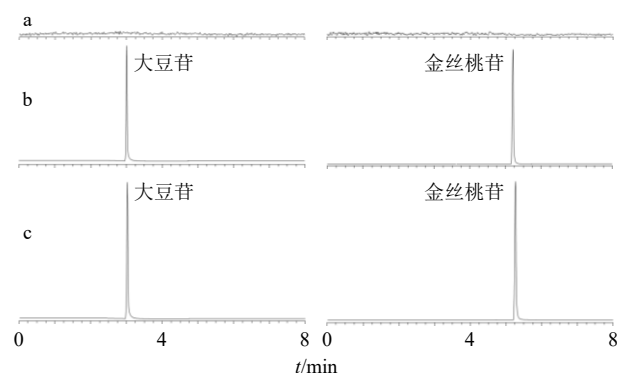


图 9 空白血浆 (a)、金丝桃苷对照品血浆溶液 (含内标, b)、血浆样品溶液 (含内标, c) 的 UPLC-MS/MS 色谱图
Fig. 9 UPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma (a), hyperoside control plasma solution (contained internal standard, b) plasma sample (contained internal standard, c)

按“2.13.1”项下色谱及质谱条件测定金丝桃苷色谱峰与大豆苷内标峰面积, 两者比值的 RSD 分别为 3.16%、2.29%、2.70%; 每天测试 1 次, 连续测试 6 d, 得金丝桃苷色谱峰与大豆苷内标峰面积比的 RSD 分别为 4.96%、5.17%、2.89%, 结果表明日内及日间精密度均良好。

2.13.7 稳定性考察 取 Hyp-PC/CS-NPs 血浆样品溶液 (给药后 0.5 h) 置于温控样品盘 (恒温 25 °C) 中, 分别于放置 0、3、6、9、12、24 h 进样测定, 计算得金丝桃苷色谱峰与大豆苷内标峰面积比的 RSD 为 4.26%, 表明血浆样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.13.8 提取回收率考察 取质量浓度分别为 11.67、350.00、1 400.00 ng/mL 的金丝桃苷对照品溶液 (含大豆苷), 分别按“2.13.3”项下方法处理, 按“2.13.1”项下色谱及质谱条件测定金丝桃苷与大豆苷峰面积 (记作 a); 取 50 μ L 空白血浆, 按“2.13.3”项下方法处理, 配制金丝桃苷质量浓度分别为 11.67、350.00、1 400.00 ng/mL 的血浆对照品溶液 (含大豆苷), 按“2.13.1”项下色谱及质谱条件测定峰面积 (b), 计算金丝桃苷和大豆苷的提取回收率, 公式为提取回收率= a/b 。结果显示低、中、高质量浓度金丝桃苷及大豆苷的提取回收率分别为 101.77%、95.86%、97.44% 和 97.19%, 表明该方法提取回收率较高。

2.13.9 基质效应考察 取质量浓度分别为 11.67、350.00、1 400.00 ng/mL 金丝桃苷对照品溶液 (含大豆苷), 按“2.13.1”项下色谱及质谱条件测定峰面积 (c), 计算金丝桃苷和大豆苷的基质效应, 公式为基质效应= b/c 。结果显示低、中、高质量浓度金丝桃苷及大豆苷的基质效应分别为 98.12%、100.56%、97.03% 和 96.94%, 表明金丝桃苷及大豆苷基质效应均较小, 可用于测定血药浓度。

2.13.10 检测限与定量限考察 取金丝桃苷质量浓度为 35.00 ng/mL 血浆对照品溶液, 使用流动相逐步稀释, 按“2.13.1”项下色谱及质谱条件进样测定, 以信噪比 (S/N) 分别为 3 和 10 确定检测限和定量限, 结果金丝桃苷的检测限和定量限分别为 1.17、3.50 ng/mL。

2.13.11 药动学考察结果 按照“2.13.1”项下色谱及质谱条件测定各采血时间点血浆样品中金丝桃苷的含量, 绘制金丝桃苷原料药、物理混合物和 Hyp-PC/CS-NPs 的药-时曲线, 结果见图 10。采用

DAS 2.0 软件进行数据拟合, 根据非房室模型统计矩法分别计算各组样品的药动学参数, 结果见表 11。与金丝桃苷原料药相比, 物理混合物的半衰期 ($t_{1/2}$) 无显著性改变 ($P>0.05$), 而达峰时间 ($t_{\max}$)、达峰浓度 ($C_{\max}$)、药-时曲线下面积 ($AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$) 具有显著性差异 ($P<0.05$), 可能是因为磷脂酰胆碱与壳聚糖辅料对金丝桃苷的口服吸收具有一定的影响^[11-12], 在一定程度上增加了其吸收。与金丝桃苷原料药或物理混合物相比, Hyp-PC/CS-NPs 药动学参数均具有极显著性改变 ($P<0.01$), 表明 Hyp-PC/CS-NPs 体内药动学行为发生了很大变化, 其中 $t_{\max}$ 延后至 (2.72 ± 0.37) h, $t_{1/2}$ 延长至 (5.51 ± 0.92) h, $C_{\max}$ 增加至 ($1\ 024.86\pm373.85$) ng/mL, 均具有极显著性差异 ($P<0.01$)。Hyp-PC/CS-NPs 相对口服生物利用度增加至 4.11 倍, 证明显著增加了金丝桃苷口服吸收。

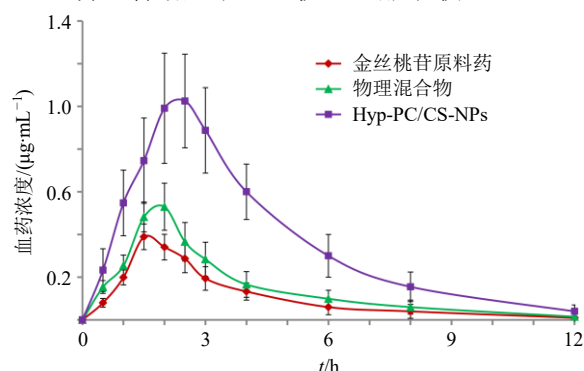


图 10 金丝桃苷原料药、物理混合物和 Hyp-PC/CS-NPs 的药-时曲线 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Profiles of plasma concentration-time of hyperin bulk drug, physical mixture, Hyp-PC/CS-NPs ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

表 11 主要药动学参数 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 11 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

参数	单位	金丝桃苷原料药	物理混合物	Hyp-PC/CS-NPs
$t_{\max}$	h	1.41±0.29	1.99±0.41*	2.72±0.37***
$t_{1/2}$	h	3.19±0.67	3.43±0.71	5.51±0.92***
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	389.63±87.94	529.17±114.66*	1 024.86±373.85***
$AUC_{0\sim t}$	ng·h·mL ⁻¹	1 211.62±207.31	1 682.54±286.72*	4 982.80±847.19***
$AUC_{0\sim\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	1 274.07±213.24	1 726.91±292.68*	5 186.24±897.10***

与金丝桃苷原料药比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与物理混合物比较: *** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs hyperoside bulk drug; *** $P<0.01$ vs physical mixture.

3 讨论

前期曾采用戊二醛作为交联剂制备金丝桃苷壳聚糖纳米粒^[12], 但最佳处方包封率不足 60%, 而使用磷脂酰胆碱代替三聚磷酸盐制备 Hyp-PC/CS-

NPs 时, 最佳处方包封率大于 80%, 这可能是由于磷脂酰胆碱与金丝桃苷相容性更高^[12], 有利于其被包载。本研究采用滴入法制备了 Hyp-PC/CS-NPs, 推测形成过程如下: 将金丝桃苷溶于含磷脂酰胆碱乙醇溶剂, 并滴入壳聚糖水溶液时, 由于带负电荷的磷脂酰胆碱与带正电荷的壳聚糖之间可发生静电引力、非共价结合等作用^[14-16], 因而具有自发形成纳米粒的倾向; 同时作为疏水性药物, 金丝桃苷与亲脂性的磷脂酰胆碱之间具有良好的相容性^[1], 因而最终形成金丝桃苷和磷脂酰胆碱包封于核心、壳聚糖覆盖于外壳的 Hyp-PC/CS-NPs。

由于 Hyp-PC/CS-NPs 口服后需经历胃肠道吸收, 故释药介质也使用模拟胃、肠液进行考察, 更能反映体内实际情况。金丝桃苷原料药及 Hyp-PC/CS-NPs 在模拟胃液中累积释放率有下降情况, 这与金丝桃苷在酸性介质中稳定性差有关^[5]。Hyp-PC/CS-NPs 在模拟胃液中累积释放率远高于金丝桃苷原料药, 可能是因为 Hyp-PC/CS-NPs 对包封于内部的金丝桃苷起到了保护作用, 增加了其稳定性, 有利于提高其体外释药量及胃肠道吸收量。

物理混合物的 $t_{\max}$ 发生延后, 可能是由于处方中的壳聚糖具有增加金丝桃苷的生物黏附性的作用^[18], 从而对其吸收速率及 $t_{\max}$ 产生了影响。物理混合物的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 药动学参数均有显著性增加 ($P<0.05$), 一方面是由于处方中磷脂酰胆碱可增加其的亲水性, 增加其溶解度及溶出度, 协助其透膜吸收等^[19-20], 对金丝桃苷口服吸收起到了积极作用; 另一方面, 处方中的壳聚糖可打开上皮细胞的紧密连接、促进药物渗透及吸收等^[21-22]。因而在 2 种辅料促吸收作用下, 使物理混合物中的金丝桃苷相对生物利用度增加至原料药的 1.39 倍。Hyp-PC/CS-NPs 的 $t_{\max}$ 显著性延后至 (2.72 ± 0.37) h, 可能是由于壳聚糖包覆在 Hyp-PC/CS-NPs 表面, 从而赋予 Hyp-PC/CS-NPs 具有一定的胃肠道黏附性^[23-24], 且 Hyp-PC/CS-NPs 释药过程具有缓释特征, 最终使 Hyp-PC/CS-NPs 的 $t_{\max}$ 显著性延后 ($P<0.01$)。

金丝桃苷在胃液中稳定性差, 将其制备成 Hyp-PC/CS-NPs 可对包封药物起到保护作用, 降低了其在胃部的降解几率, 因而使后期吸收进入血液循环的量增加, 导致 Hyp-PC/CS-NPs 的 $t_{1/2}$ 值显著性增大 ($P<0.01$)。Hyp-PC/CS-NPs 相对口服生物利用度显著性提高, 可能是由于 Hyp-PC/CS-NPs 增加了

金丝桃苷溶解度和溶出度、降低降解几率等,增加了其体内吸收量;金丝桃苷在 Hyp-PC/CS-NPs 中以无定形形态存在,无定形药物往往具有更高的生物利用度^[13];Hyp-PC/CS-NPs 处方中含有壳聚糖,壳聚糖可抑制 P-糖蛋白外排作用^[14],增加其体内吸收;Hyp-PC/CS-NPs 比表面积较大,增加了药物与胃肠道接触几率,有利于药物经胞间转运、淋巴转运等途径进入体循环,提高了药物吸收效率^[6]。

综上,Hyp-PC/CS-NPs 制备工艺相对简单,载体辅料安全性好,包封率大于 80%,满足了《中国药典》2020 年版四部 9014 项下对微粒制剂包封率的要求。Hyp-PC/CS-NPs 冻干粉稳定性良好,显著促进了金丝桃苷口服吸收,为后续药效学评价奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁子涵,王旖瑶,赖逸翔,等.刺五加提取物及其活性成分免疫调节作用的研究进展[J].中草药,2022,53(15):4895-4904.
- [2] Xu S J, Chen S P, Xia W X, *et al.* Hyperoside: A review of its structure, synthesis, pharmacology, pharmacokinetics and toxicity [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 3009.
- [3] 薛彩福,郭建明,钱大玮,等.黄葵醇提取物中黄酮类成分在体肠吸收研究[J].药学学报,2011,46(4):454-459.
- [4] 孙纯勇,王玲娜,颜培正,等.体外仿生消化对金银花醇提物成分及抗氧化活性的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(1):117-123.
- [5] 曹小帅,沙美,欧阳强,等.黄蜀葵花中4种黄酮类成分体内整合药动学研究[J].中草药,2010,41(2):255-259.
- [6] 张艳慧,董亚娜,谈秀凤.金丝桃苷纳米结构脂质载体制备及其体内药动学研究[J].中成药,2023,45(10):3382-3386.
- [7] Feng Y F, Qin G Z, Chang S Y, *et al.* Antitumor effect of hyperoside loaded in charge reversed and mitochondria-targeted liposomes [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16: 3073-3089.
- [8] 李伟宏,郑伟,王风云,等.金丝桃苷磷脂复合物及其介孔二氧化硅纳米粒的制备和口服药动学研究[J].中草药,2023,54(13):4157-4167.
- [9] 葛勇琪,孙晓然,尚宏周,等.中空介孔硅基双重响应型药物缓释载体制备及性能研究[J].化学与生物工程,2023,40(7):18-22.
- [10] 孟雨婷,薛玉叶,刘燕,等.甘草新型自组装纳米粒的形成及抗炎作用评价[J].中草药,2024,55(9):2912-2922.
- [11] 刘立军.治疗表皮原发性细菌感染的壳聚糖/磷脂自组装纳米粒的制备及评价[D].青岛:青岛大学,2023.
- [12] 沈英,黄雅菲,宋帆帆,等.利格列汀壳聚糖-磷脂自组装纳米粒的制备及体内外评价[J].药物评价研究,2024,47(2):345-352.
- [13] 刘万路.柚皮素磷脂酰胆碱复合物滴丸处方优化及口服药动学评价[J].中草药,2023,54(19):6253-6263.
- [14] Liu L J, Ma Q M, Wang S N, *et al.* Efficient epidermal delivery of antibiotics by self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for enhanced therapy on epidermal bacterial infections [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 218: 568-579.
- [15] Saha P, Singh P, Kathuria H, *et al.* Self-assembled lecithin-chitosan nanoparticles improved rotigotine nose-to-brain delivery and brain targeting efficiency [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 851.
- [16] 幸瑞.白藜芦醇季铵化壳聚糖脂质体的制备及其免疫佐剂效果评价[D].雅安:四川农业大学,2023.
- [17] Zewail M B, El-Gizawy S A, Asaad G F, *et al.* Development of famotidine-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for prolonged and efficient anti-gastric ulcer activity [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2024, 91: 105196.
- [18] Dawoud M H S, Mannaa I S, Abdel-Daim A, *et al.* Integrating artificial intelligence with quality by design in the formulation of lecithin/chitosan nanoparticles of a poorly water-soluble drug [J]. *AAPS Pharm SciTech*, 2023, 24(6): 169.
- [19] 陈晓敏,曹伶俐,崔伟峰.鼠李素磷脂复合物的处方工艺优化、表征及体外溶出度考察[J].中国医院药学杂志,2022,42(4):399-403.
- [20] 田莉,李伟宏,张付利.木犀草素磷脂复合物白蛋白纳米粒的制备及口服药动学评价[J].中草药,2024,55(10):3280-3290.
- [21] 刘万路.牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体的制备、表征和口服药动学研究[J].中草药,2023,54(24):8018-8030.
- [22] 殷旭东,蒋明星.谷氨酸/N-琥珀酰化壳聚糖水凝胶的制备和性能[J].化学与生物工程,2023,40(1):53-57.
- [23] 陈容,田莉,薛晓菲,等.葫芦素B纳米混悬剂制备及其体内药动学研究[J].中成药,2023,45(12):3872-3878.
- [24] 董亚楠,任书强,柳超,等.蒙花苷疏基化纳米胶束的制备、表征及其口服吸收生物利用度评价[J].中草药,2023,54(23):7776-7787.

[责任编辑 郑礼胜]